

407704

F.C. 27-XII-74

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para todo el territorio nacional, a favor del Patronato de Investigación Científica y Técnica "Juan de la Cierva" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con domicilio en calle Serrano, 150. Madrid. (Inventor: Dr. J. Garrido Márquez), por un "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS A PARTIR DE ETANOL DE SINTESIS", según la siguiente

MEMORIA DESCRIPTIVA

La producción de proteínas a partir de sustancias hidrocarbonadas tiene un interés mayor cada día, teniendo en cuenta el aumento de la demanda correspondiente al crecimiento de la población. Hoy día, aún cuando se llegase a hacer un rápido control de la natalidad nadie pone en duda que para final de siglo la población en el mundo será de 8.000 millones de seres humanos, ni el incre-

5

POOR
QUALITY

407704

10 mento de producción agrícola ni el mejor aprovechamiento de los mares podrán suplir por si solos las necesidades proteínicas de esta población creciente. Como soluciones inmediatas se plantean para los años 90 de este siglo, por un lado, la producción de algas para aprovechar la fotosíntesis y, por otro, el aprovechamiento de los hidrocarburos para la producción de levaduras.

15 Mucho se está trabajando en esta línea pero, aunque se han realizado grandes avances, la obtención de levadura a partir de residuos de la destilación del petróleo presenta dos inconvenientes: la necesidad de un proceso de purificación de la levadura obtenida para eliminar los restos de hidrocarburos que la impregnan, y la necesidad de mayores cantidades de energía para mantener homogénea la mezcla de las tres fases constituidas por aire, hidrocarburo y levadura en medio acuoso, lo cual hace imprescindible el empleo de turbinas de alto número de revoluciones y tanques cerrados para trabajar a presión. Ambos inconvenientes se traducen en un mayor costo del proceso.

20 En el procedimiento que patentamos se ha estudiado un nuevo proceso de producción de proteínas a partir de residuos de la destilación de petróleo que ofrece considerables ventajas:

25 La multiplicación de levadura se lleva a cabo sobre el alcohol etílico obtenido por síntesis a partir de residuos de petróleo, por tanto se utilizan en este proceso los residuos de la destilación de petróleo pero la levadura multiplica directamente sobre el alcohol etílico obtenido a partir de estos residuos lo cual da lugar a la obtención de levadura de gran pureza y de características muy estables.

30 La producción de alcohol etílico a partir de etileno es hoy en día un proceso barato y un medio de aprovechamiento del etileno, subproducto en algunos casos de la destilación del petróleo. El alcohol etílico de síntesis ha desplazado en el mercado mundial, en aplicaciones industriales, al alcohol

etílico de fermentación por 2 motivos principales: por su pu
reza, y lo que es mas importante, por su bajo costo de obten
ción.

45

El procedimiento que patentamos ha sido conseguido a -
través de varios años de estudios fisico-químicos, bioquímicos
y tecnológicos, llevados a cabo en el Instituto de Fermenta -
ciones Industriales. En 1.959 SAAVEDRA y GARRIDO pusieron de
manifiesto que las levaduras de flor utilizaban como princi -
pal fuente hidrocarbonada el alcohol etílico, ésto se compro
bó estudiando las condiciones de añejamiento de los vinos.

50

Posteriormente, estudios con levaduras de "flor" en cul
tivo sumergido, permitieron diseñar un tipo de fermentador
que permite mantener las temperaturas adecuadas y las condi
ciones de aireación y agitación precisas para el máximo des -
arrollo de las especies de levaduras utilizadas en un corto
tiempo de cultivo (20-30 horas) sobre medios alcohólicos. Los
trabajos de CABEZUDO, LLAGUNO y GARRIDO (1.968) y LLAGUNO,
FERNANDEZ, GARRIDO Y GARRIDO (1.971) dieron lugar a modifica
ciones importantes en cuanto a composición del medio cultivo,
temperatura del proceso, edad de la siembra de levaduras y -
nuevos dispositivos mecánicos de aireación intermitente. Asi
mismo se establecieron los niveles de actividad de la enzi
ma alcohol deshidrogenasa que caracteriza a las especies de
levaduras de flor capaces de asimilar etanol como única fuen
te de carbono en medios con altas concentraciones en etanol
(FERNANDEZ, GARCIA, LLAGUNO y GARRIDO, 1.972).

55

60

65

En el procedimiento que patentamos se utilizan especies
de levaduras llamadas de "flor" que, según nuestros anterio
res estudios, se caracterizan por el alto nivel de actividad
específica de la enzima alcohol deshidrogenasa que contienen.
Las cepas de levaduras de "flor" seleccionadas por nosotros
utilizan el alcohol etílico y multiplican rápidamente sobre
dicho sustrato. Su tiempo de generación es relativamente cor
to y consumen etanol con un rendimiento del 60 al 90% en cuan
to al peso seco de levaduras obtenidas.

70

75

407704

80 Las especies seleccionadas para el procedimiento que patentamos tienen varias ventajas para su aplicación a la obtención de proteínas: presentan altos contenidos en sus células de sustancias insaponificables lo que es de interés como fuente de vitamina D₂, y, algunas de estas cepas pueden ser especialmente aplicadas a la fermentación para 85 ría por su alto poder fermentativo y las excelentes condiciones en que se conserva esta levadura prensada.

Entre las levaduras seleccionadas la especie de levadura de flor, *Sacharomyces cheresiensis* (Cepa-V-24 de la Colección de nuestro Instituto de Fermentaciones Industriales, aislada en vinos de Andalucía Occidental) se considera 90 óptima para su multiplicación sobre etanol, debido a sus características fisiológicas y microbiológicas y a su sistema enzimático que le permiten una utilización total del etanol con buenos rendimientos en determinadas condiciones.

95 MODO DE OPERAR

Para el proceso de producción de levadura a partir de etanol de síntesis, se utiliza la especie de levadura de flor *Saccharomyces cheresiensis* (Cepa V-24 de la Colección del Instituto de Fermentaciones Industriales). Dicha cepa 100 se conserva sobre estria de agar-malta en tubo de ensayo a baja temperatura.

A partir de estas pátinas, la cepa V-24 de *Saccharomyces cheresiensis* se siembra sobre agar-malta en frascos Roux que se mantienen para su desarrollo en estufa a 26-28°C. 105 Después de un tiempo de cultivo de 1-4 días, las células así desarrolladas, suspendidas en agua estéril, se emplean como inóculo para los cultivos en fermentador.

El medio cultivo, empleado en este proceso, contiene sales minerales para aportar fósforo y magnesio, y sulfato amónico y urea como fuente de nitrógeno. Como aparte de factores de crecimiento pueden emplearse melazas, corn steep liquor, extracto de levadura o cualquier otra solución acuosa 110

407704

115 sa o hidroalcoholica de nutrientes que aporten vitaminas,
oligoelementos aminoácidos u otras sustancias nitrogena
das, o bien, cualquier otra adición que aporte estos fac
tores en cantidad suficiente para que no exista ningún -
factor limitante del desarrollo. A este medio de cultivo
se añade el etanol (en concentración de 0,5 a 4%) que cons
tituye la principal fuente de carbono en este proceso de
120 obtención de levadura.

Dicho procedimiento de obtención de levadura se lle
va a cabo sobre un medio de cultivo que contiene: de 0,02
a 0,2 g/l de fosfato monopotásico, de 0,02 a 0,2 g/l de
sulfato amónico o urea, de 0,01 a 0,1 g/l de sulfato mag
125 nésico, de 1 a 100 ml. de corn steep liquor, melaza, o de
solución de extracto de levadura u otras formas de adición
de estos factores de crecimiento.

El cultivo se realiza en fermentadores de acero ino
xidable capaces de producir una agitación, aireación y tem
130 peratura optima para el procedimiento.

Una vez inoculado el fermentador con las celulas pro
cedentes de la pátina sobre agar-malta el cultivo se mantie
ne hasta que el microorganismo se halle en fase logaritmi
ca de crecimiento. En este punto se conecta a fermentado
135 res de mayor tamaño o a dispositivos de aireación intermi
tente de forma que la relación inóculo / medio de cultivo
sea de 1/10. De este modo, es posible obtener grandes ma
sas de levaduras de una gran pureza.

La agitación del medio de cultivo y la aireación apli
140 cadas, dependen del tipo de fermentador empleado, conside
rándose eficaz, para obtener una buena velocidad de creci
miento, una aireación de 200-500 cc. de aire por litro de
medio cultivo y por minuto. La temperatura de cultivo debe
mantenerse en 20-28°C temperaturas superiores influyen des
145 favorablemente en el normal desarrollo de la levadura y en
la conservación de sus características.

150 En este proceso de obtención de levadura a partir de
etanol de síntesis, es fundamental la especie de levadura
utilizada. La especie de levadura de flor empleada (Saccha
romyces cheresiensis, cepa V-24 de la Colección del Insti-
tuto de Fermentaciones Industriales, aislada en vinos de
Andalucía Occidental) ha sido seleccionada por sus caracte-
rísticas fisiológicas y microbiológicas y por su sistema
enzimático que la presentan como especie óptima para la -
155 utilización total del etanol, en determinadas concentracio-
nes, con un buen rendimiento en peso seco de levadura por
etanol consumido.

REIVINDICACIONES

Se reivindica como de la nueva y propia invención:

160 1) "Un procedimiento para la obtención de proteínas
a partir de etanol de síntesis" caracterizado porque la
especie de levadura de flor Saccharomyces cheresiensis -
(cepa V-24 de la Colección del Instituto de Fermentacio-
nes Industriales), se siembra sobre agar-malta en frascos
165 Roux que se mantienen para su desarrollo en estufa a -
26-28°C durante un tiempo de cultivo de uno a cuatro días
empleando las células así desarrolladas y suspendidas en
agua estéril como inóculo para los cultivos en fermentador.

170 2) "Un procedimiento para la obtención de proteínas
a partir de etanol de síntesis" según reivindicación 1) y
caracterizado además porque el medio de cultivo empleado
contiene sales minerales para aportar fósforo y magnesio
y sulfato amónico y urea como fuente de nitrógeno. Como -
aporte de factores de crecimiento pueden emplearse melazas,
175 corn steep liquor, extracto de levadura, o cualquier otra
solución acuosa o hidroalcohólica de nutrientes que aporten
vitaminas, oligoelementos aminoácidos u otras sustancias -
nitrogenadas, o bien cualquier otra adición que aporte es-
tos factores en cantidad suficiente para que no exista nin-
180 gún factor limitante del desarrollo.

3) "Un procedimiento para la obtención de proteínas
a partir de etanol de síntesis" según reivindicaciones 1)

407704

185 y 2) y caracterizado además porque a este medio de cultivo se añade el etanol en concentración de 0,5 a 4% conteniendo el medio de cultivo de 0,02 a 0,2 g/l de fosfato monopotásico, de 0,02 a 0,2 g/l de sulfato amónico o urea, de 0,01 a 0,1 g/l de sulfato magnésico, de 1 a 100 ml de corn steep liquor melaza o de solución de extracto de levadura u otras formas de adición de estos factores de crecimiento.

190 4) "Un procedimiento para la obtención de proteínas a partir del etanol de síntesis" según reivindicaciones 1), 2) y 3) y caracterizado además porque el cultivo se realiza en fermentadores de acero inoxidable capaces de producir una agitación, aireación y temperatura óptima para el procedimiento.

195 5) "Un procedimiento para la obtención de proteínas a partir del etanol de síntesis" según reivindicaciones 1), 2), 3) y 4) y caracterizado además porque una vez inoculado el fermentador con las células procedentes de la pátina sobre agar-malta el cultivo se mantiene hasta que el microorganismo se halle en fase logarítmica de crecimiento. En este punto se conecta a fermentadores de mayor tamaño o a dispositivos de aireación intermitente de forma que la relación inóculo / medio de cultivo sea de 1/10.

200 6) "Un procedimiento para la obtención de proteínas a partir del etanol de síntesis" según reivindicaciones 1), 2), 3), 4) y 5) y caracterizado además porque la agitación de medio de cultivo y la aireación aplicadas, dependen del tipo de fermentador empleado, considerándose eficaz, para 205 obtener una buena velocidad de crecimiento, una aireación de 200-500cc. de aire por litro de medio cultivo y por minuto.

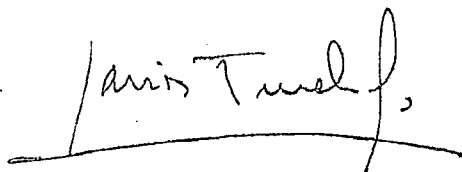
210 7) "Un procedimiento para la obtención de proteínas a partir del etanol de síntesis" según reivindicaciones 1), 2), 3), 4), 5) y 6) y caracterizado además porque la temperatura de cultivo debe mantenerse en 20-28°C ya que temperaturas superiores influyen desfavorablemente en el normal -

desarrollo de la levadura y en la conservación de sus ca
racterísticas.

220

8) "Un procedimiento para la obtención de proteínas
a partir del etanol de síntesis" tal y como se describe
en el cuerpo de esta Memoria que consta de ocho páginas
escritas por una sola cara.

Madrid, 17 de Octubre 1.972.

Handwritten signature of Luis Tuel, consisting of the name 'Luis Tuel' in cursive script, followed by a comma and a long horizontal flourish line.